

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 14 日現在

機関番号：13301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22870011

研究課題名（和文） 高速原子間力顕微鏡によるミオシン 6 の運動メカニズムの解明

研究課題名（英文） Study of motile mechanism of myosin VI using high-speed atomic force microscopy

研究代表者

古寺 哲幸 (KODERA NORIYUKI)

金沢大学・バイオ AFM 先端研究センター・准教授

研究者番号：30584635

研究成果の概要（和文）：

ミオシン 6 は、ミオシンスーパーファミリーの中で唯一アクチンフィラメントのマイナス端に向かって移動するミオシンで、脚が短いにも関わらず大きな歩幅で運動することが分かっている。しかしながら、それらが運動する最中の構造的な情報は一切得られていないため、その運動メカニズムは未解明であった。そこで、本研究では、高速原子間力顕微鏡を用いて、運動中のミオシン 6 の構造形態変化を直接観察した。その結果、その運動メカニズムの解明につながる構造的証拠を得ることに成功した。

研究成果の概要（英文）：

Myosin 6 is the only myosin among myosin superfamily that moves to the minus end of actin filament. Interestingly, it is known that myosin 6 walks with larger stride than that expected from their foot length. However, their functional mechanism has not been elucidated yet, due to the lack of structural evidence. Here, we performed high-speed atomic force microscopy to directly observe their structural dynamics of myosin 6 at work. Then, the structural evidence was successively obtained for the first time, leading to better understanding the functional mechanism of myosin 6.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011 年度	1,160,000	348,000	1,508,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

研究分野：生物物理学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：ミオシン、アクチン、モータータンパク質、一分子計測・操作、原子間力顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

ミオシン 6 は、細胞内で小胞輸送や特定の構造を保持するためのアンカーとして機能している。ミオシン 6 は、ミオシンスーパーファミリーの中で唯一アクチンフィラメン

トのマイナス端方向に進むミオシンであり、そのユニークな運動メカニズムを解明するために、国内外で活発に研究が行われている (Spudich & Sivaramakrishnan, *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 128-137 (2010))。その中で

も驚くことは、ミオシン6が構造的に予想されていたステップサイズ(約12 nm)よりも大きなステップサイズ(アクチンフィラメントのヘリカルハーフピッチに相当する約36 nm)でハンドオーバーハンド運動することである(Rock *et al.*, *PNAS* **98**, 13655-13659 (2001), Nishikawa *et al.*, *BBRC* **290**, 311-317 (2002))。このことは、ミオシンの運動メカニズムを説明するのに広く受け入れられているレバーアーム説と矛盾するため、大きな注目を集めている。近年、レバーアーム部の後に続くコイルドコイル領域の一部が運動中に解けることで約36 nmの歩幅を確保していることが示唆されている。このことは、ミオシン6の運動もレバーアーム説と矛盾しなくなるため受け入れられやすいが、その構造形態をとったミオシン6・アクチン複合体の構造的証拠は提出されていない。これまでに唯一得られている電子顕微鏡写真では、運動中の条件を撮影したにも関わらず、2つのモーター部を大きく広げた構造は全く確認できないのである。そのため、レバーアーム説とは違う運動モデルが提唱されている(Nishikawa *et al.*, *BBRC* **290**, 311-317 (2002))。また最近では、運動中のミオシン6を高速・高感度カメラで蛍光顕微鏡観察すると、大小のステップサイズが見られ、単純なハンドオーバーハンド運動では説明できない振る舞いも報告されている(Ikezaki *et al.*, *生物物理 SUPPLEMENT* **49**, S127 (2009))。このように盛んに研究されてきたが、その運動メカニズムに関する統一見解は得られていない。より直接的な手法でミオシン6の運動を観察することが望まれている。

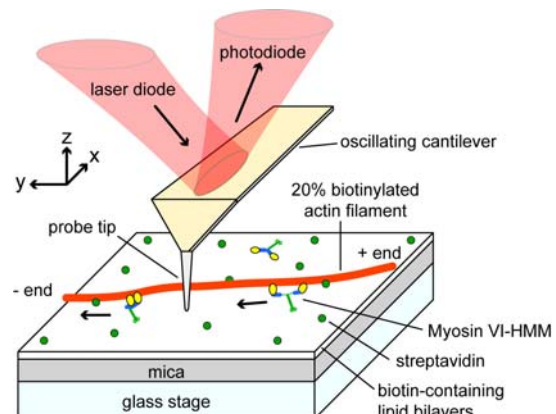
2. 研究の目的

研究代表者は、溶液中で生体分子をナノメートルスケールの解像度で観察できる唯一の顕微鏡である原子間力顕微鏡(Atomic Force Microscope: AFM)の高速化にこれまで取り組み、ビデオレート程度(20 - 50 ms/frame)の時間分解能を持った世界最高性能の高速原子間力顕微鏡(高速AFM)を実現してきた(Ando *et al.*, *PNAS* **98**, 12468-12472 (2001), Ando *et al.*, *Prog. Surf. Sci.* **83**, 337-437 (2008))。そこで、本研究課題では、この高速AFMを用いて、運動中のミオシン6の構造形態変化を直接観察することで、その動作メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

高速AFMは、研究代表者が自ら開発してきた、高速走査技術や高速制御技術が搭載された最新式のものを用いた。アクトミオシン6の運動観察が効率よく進められるように、必要に応じて機械部品や電気回路を開発・改良

を行った。ミオシン6のサンプルは、ミオシン6の運動アッセイに広く用いられているin vitroでダイマーをとるものを用いた。このサンプルに関する知見はこれまでに蓄積されており、高速AFMで得られた結果の妥当性を評価する上で重要と考えた。また、運動アッセイの実験系には、生体適合性の脂質二重膜を用いて、特定の生体分子の活性を保ったまま観察基板に固定する手法を用いた(図1)。図1を詳しく説明する。サンプルステージとして、φ2 mm、高さ2 mmのガラスステージを用いた。その上にφ1 mm、厚さ0.05 mm程度のマイカディスクをエポキシ系接着剤で固定した。新しく劈開したマイカ表面に、常温でゲル相にある脂質分子のリポソームを展開させることで、脂質二重膜を得た(Yamamoto *et al.*, *Methods in Enzymol.* **475**, 541-564 (2010).)。その脂質二重膜の親水基には、中性電荷を持ったもの(DPPC)を主成分に、アクチンフィラメントとミオシン5を緩やかに基板表面に束縛するために正電荷を持ったもの(DPTAP)と、ビオチン化したアクチンフィラメントをストレプトアビジンを介して固定化するためにビオチンを持ったもの(biotin-cap DPPE)を用いた。この系では、アクチンフィラメントが基板表面にストレプトアビジンを介して選択的に固定されており、ミオシン6は基板表面からの非特異的な吸着がないために自由に運動できる。この実験系は、同じくミオシンスーパーファミリーに属するミオシン5の運動観察において有用性が実証されている(Kodera *et al.*, *Nature* **468**, 72-76 (2010))。

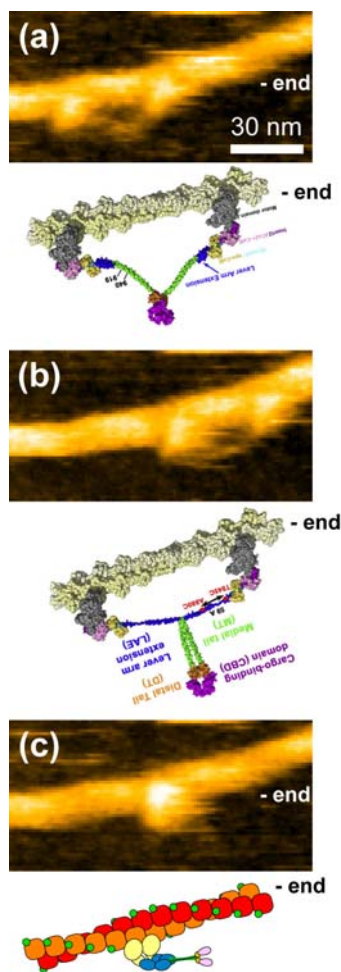


(図1: 高速AFMでミオシン6の運動を観察するための実験系)

4. 研究成果

上記の運動アッセイの実験系を用いて、ATP存在下で運動中のミオシン6の構造形態変化を直接観察したところ、運動中のミオシン6は大小のステップサイズで前進運動ならびに稀に後進運動を起こすことが直接観察された。そのときの運動様は、ハンドオーバ

一ハンド様とインチワーム様が混在していた。この結果は、近年報告された蛍光顕微鏡法の結果と矛盾しない (Nishikawa et al., Cell 142, 879-888 (2010))。また、① 2つのモーター部を大きく広げた構造形態をとることで大きなステップ運動をすること (図 2 a, b)、② 2つのモーター部が隣り合うアクチンのサブユニット上に寄り添うような形で結合し (図 2 c)、この構造形態でアクチンフィラメント上に滞在する時間が長いことが直接的に明らかとなった。②の構造形態は、細胞内の特定の構造を保持するためのアンカーとして働くミオシン 6 の機能を説明するものであると考える。以上は、運動中のミオシン 6 の構造形態変化を直接捉えた画期的な成果である。



(図 2: 高速 AFM で観察されたミオシン 6 の運動中の代表的な構造形態)

近年、ミオシン 6 が①の構造形態をとるときに、ミオシン 6 の脚のどの部分が広がっているのかが世界で論争中である。この課題は、ミオシン 6 の運動メカニズムの根本を担うため重要度が高い。これまでに、世界では 2 つのモデルが提唱されている。1 つ目のモデル

はコイルドコイル部が裂けるとするモデルで (Spink et al., Nat. Struct. Mol. Biol. 15, 591-597 (2008))、2 つ目のモデルはレバーアームの直下が伸びるというモデルで (Mukherjea et al., Mol Cell 35, 305-315 (2009)) ある。高速 AFM の観察の結果、それらが図 2 a, b のようにどちらも観察された。つまり、まだ空間分解能が十分ではないが、高速 AFM による直接観察の結果は、どちらのモデルも成立していることをサポートしている。この結果は、多分子の平均像から結論を導くという従来の研究手法では、決して導くことができないものである。よって、1 つの分子の構造形態を詳細に観察できる高速 AFM ならではの結果であるといえる。ただし、2 つの構造形態がどのような条件下でスイッチされるのかを解明するのは、今後の課題である。

また、本研究において、ミオシン 6 のヌクレオチド依存的な構造形態やそのダイナミクスを観察することも研究課題の一つにあげていたが、上記のより重要な課題に集中しなければならなかったため、研究が進んでいない。しかしながら、ATP 存在下で運動中のモータードメインに注目すると前足のコンバーター部位の構造がアクチンフィラメントの相互作用時間に応じて変化していることが観察されている。したがって、この課題の実施した場合に得られる結果を推測することができている。

今後は、上記のまだ未解明な課題について、さらに研究を深め、ミオシン 6 の運動メカニズムを詳細に明らかにしたい。また、近年、ミオシンスーパーファミリーに属するミオシン 10 に関しても、構造的には短い脚しか持たないにも関わらず、アクチンフィラメント上を大きな歩幅で、アクチンフィラメントのプラス端に向かってプロセッシブ運動できることが報告されている (Sun et al., Nat. Struct. Mol. Biol. 17, 485-491 (2010))。高速 AFM によって、運動中のミオシン 10 の構造形態変化を可視化し、その運動メカニズムとミオシン 6 やミオシン 5 のものを比較できれば、ミオシン間の運動の共通点や相違点を明らかにすることできるだろう。そこから、ミオシン全般の運動機構がより詳細に理解できると思われる。よって、そのような研究を展開していきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Uchihashi, T., Kodera, N., Ando, T. Guide to video recording of structure

dynamics and dynamic processes of proteins by high-speed atomic force microscopy. *Nature Protocols* (in press). 査読有

2. 安藤敏夫, 古寺哲幸. 高速原子間力顕微鏡によるタンパク質の動態撮影. *生物物理* **51**, 022-025 (2011). 査読有
3. Kodera, N., Yamamoto, D., Ishikawa, R. & Ando, T. Video imaging of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy. *Nature* **468**, 72-76 (2010). 査読有
4. Yamamoto, D., Uchihashi, T., Kodera, N., Yamashita, H., Nishikori, S., Ogura, T., Shibata, M. & Ando, T. High-speed atomic force microscopy techniques for observing dynamic biomolecular processes. *Methods in Enzymol.* **475**, 541-564 (2010). 査読有
5. Shinohara, K., Kodera, N., & Oohashi, T. Single-molecule imaging of photodegradation reaction in a chiral helical π -conjugated polymer chain. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **48**, 4103-4107 (2010). 査読有

[学会発表] (計 24 件)

1. 古寺哲幸. 高速原子間力顕微鏡による生体分子の構造ダイナミクスの観察. バイオ AFM 先端研究センター公開シンポジウム (2012 年 3 月 23 日) 金沢大学(石川県) [一般発表・口頭]
2. 内橋貴之, 古寺哲幸, 安藤敏夫. 高速原子間力顕微鏡で探るタンパク質のダイナミクス. 日本表面科学会 平成 23 年度関西支部セミナー (2012 年 3 月 7 日) 京都大学 宇治キャンパス (京都府). [国内会議招待講演]
3. 古寺哲幸, 森哲哉, 安藤敏夫, 相沢慎一. 高速 AFM による FliK の構造動態の観察. 2011 年度べん毛研究交流会 (2012 年 3 月 9 日~11 日) ラフォーレ修善寺(静岡県). [一般発表・口頭]
4. 古寺哲幸. Video imaging of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy. 循環器学研究振興基金賞(内田賞) 授与式 (2012 年 2 月 18 日) 八重洲富士屋ホテル (東京都). [受賞講演・口頭]
5. Uchihashi, T., Kodera, N., Ando, T. Direct Visualization of Proteins in Action by High-Speed Atomic Force Microscopy. The 10th Asia-Pacific Microscopy Conference (APMC 10) (2012 年 2 月 5 日~9 日) Perth (Australia). [国際会議招待講演]
6. Ando, T., Kodera, N., Uchihashi, T.

High-speed Atomic Force Microscopy coming of age. 19th International Colloquium of Scanning Probe Microscopy (2011 年 12 月 19 日~21 日) Lake Toya (Hokkaido, Japan). [国際会議招待講演]

7. 古寺哲幸, 山本大輔, 安藤敏夫. 高速原子間力顕微鏡による歩行運動中のミオシン V のビデオ観察. CREST「生命現象の解明と応用に資する新しい計測・分析基盤技術」研究領域シンポジウム (2011 年 12 月 12 日~13 日) 東京ガーデンパレス(東京都). [一般発表、ポスター発表].
8. 内橋貴之, 古寺哲幸, 安藤敏夫. 高速原子間力顕微鏡で明らかにするタンパク質のダイナミクス. 日本顕微鏡学会走査型プローブ顕微鏡 (SPM) 分科会 平成 23 年度オープン研究会 走査型プローブ顕微鏡における最先端技術~イノベーションのキーテクノロジー (2011 年 12 月 12 日) 独立行政法人物質・材料研究機構(茨城県). [国内会議招待講演]
9. Kodera, N., Takhara, Y., Miyata, M., Ando, T. Structural dynamics of Gli349 and Gli521 isolated from the gliding machinery of *Mycoplasma mobile* studied by high-speed atomic force microscopy. The 5th Meeting of the Asian Organization for Mycoplasma (2011 年 10 月 19 日~21 日) Nagasaki-ken Medical Association (Nagasaki, Japan). [国際会議招待講演]
10. 古寺哲幸, 内橋貴之, 安藤敏夫. Simultaneous observation of structure and dynamics of functioning bio-molecules by high-speed atomic force microscopy. 第 49 回日本生物物理学会年会 (2011 年 9 月 16 日~18 日) 兵庫県立大学姫路書写キャンパス (兵庫県). [国内会議招待講演 (英語)]
11. 森哲哉, 古寺哲幸, 水野志乃, 相沢慎一, 水口峰之, Szerlong, H., Porter-Goff, M., Hansen, J.C., 安藤敏夫. Direct visualization of intrinsically disordered proteins PQBP-1, MeCP2, and FliK using high-speed atomic force microscopy. 第 49 回日本生物物理学会年会 (2011 年 9 月 16 日~18 日) 兵庫県立大学姫路書写キャンパス (兵庫県). [一般発表、口頭発表 (英語) +ポスター発表]
12. 森口雄介, 半田直史, 古寺哲幸, 安藤敏夫. Direct visualization of DNA degradation processes by RecBCD using high-speed atomic force microscopy. 第 49 回日本生物物理学会年会 (2011 年 9 月 16 日~18 日) 兵庫県立大学姫路書写キャンパス (兵庫県). [一般発表、口頭発表]

- (英語) + ポスター発表]
13. 古寺哲幸. 機能中のタンパク質の構造と動きを同時観察する高速原子間力顕微鏡. 第6回構造生物学に関する先端技術講演会-NMR, AFM, EM解析のトピックス (2011年9月2日) 九州大学医学部 (福岡県). [国内会議招待講演]
 14. Kodera, N., Yamamoto, D., Ando, T. Video imaging of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy. AFM BioMed Conference (2011年8月24日~27日) Institut Curie (Paris, France) [国際会議招待講演]
 15. 古寺哲幸. 高速原子間力顕微鏡による歩行運動中のミオシンVのビデオ撮影. ほくりく健康創造クラスター「若手研究者交流会」分科会 (2011年8月1日) 高志会館 (富山県). [一般発表・口頭]
 16. 古寺哲幸. Simultaneous observation of structure and dynamics of functioning proteins by high-speed atomic force microscopy. The 1519th Biological Symposium (2011年7月26日), 国立遺伝学研究所 (静岡県). [国内会議招待講演 (英語)]
 17. 古寺哲幸, 安藤敏夫. 高速 AFM による天然変性タンパク質の直接観察. 「天然変性蛋白質」第2回領域会議 (2011年6月29日~7月1日) 青島バームビーチホテル (宮崎県). [一般発表・口頭]
 18. 古寺哲幸, 内橋貴之, 安藤敏夫. 液中ナノメートル世界をリアルタイム観察する高速原子間力顕微鏡. 日本顕微鏡学会第67回学術講演会 (2011年5月16日~18日) 福岡国際会議場 (福岡県). [国内会議招待講演]
 19. 古寺哲幸. 液中ナノメートル世界をリアルタイム観察する高速原子間力顕微鏡. 第6回基礎・臨床交流セミナー (2011年5月11日) 金沢大学医学部 (石川県). [国内会議招待講演]
 20. Ando, T., Uchihashi, T., Kodera, N. Dynamic processes of proteins filmed by high-speed AFM imaging. XIII Linz Winter Workshop (2011年2月4日~7日) Linz (Austria). [国際会議招待講演]
 21. Kodera, N., Safer, D., Sweeney, H. L., Ando, T. Direct observation of functioning myosin V and VI by high-speed atomic force microscopy. XIII Linz Winter Workshop, (2011年2月4日~7日) Linz (Austria). [国際会議招待講演]
 22. 古寺哲幸, 森哲哉, 水野志乃, 水口峰之, 相沢慎一, 安藤敏夫. 高速 AFM による天然変性タンパク質 PQBP-1 と FliK の直接観察. 日本生物物理学会第 48 回年会 (2010

- 年9月20日~22日) 東北大学川内キャンパス (宮城県). [一般発表、ポスター発表].
23. 谷本充, 津中康夫, 森川耿右, 古寺哲幸, 安藤敏夫. 高速 AFM による FACT のリン酸化された天然変性領域の観察. 日本生物物理学会第 48 回年会 (2010年9月20日~22日) 東北大学川内キャンパス (宮城県). [一般発表、ポスター発表]
 24. 宮川直也, 古寺哲幸, 谷口雅昭, 安藤敏夫. 高速原子間力顕微鏡でタンパク質の化学・力学変換を可視化するための PEG-ATP の合成. 日本生物物理学会第 48 回年会 (2010年9月20日~22日) 東北大学川内キャンパス (宮城県). [一般発表、ポスター発表].

[図書] (計2件)

1. T. Ando, N. Kodera, Chapter 33 "Visualization of mobility by atomic force microscopy" In "Experimental Tools for the Intrinsically Disordered Protein Analysis", Humana Press, (2012) (in press).
2. T. Ando, T. Uchihashi, N. Kodera, M. Shibata, D. Yamamoto, H. Yamashita, Chapter 7 (p. 189-210) "High-speed AFM for observing dynamic processes in liquid" In "Atomic force microscopy in liquid", Wiley-VCH Verlag GmbH, (2011).

[産業財産権]

○取得状況 (計1件)

名称: Laser driving of a cantilever and compensation method
発明者: T. Ando, T. Uchihashi, N. Kodera, H. Yamashita
権利者: T. Ando, T. Uchihashi, N. Kodera, H. Yamashita
種類: 特許
番号: No. US 7958565 B2
取得年月日: 2011年7月7日
国内外の別: 国外

[その他]

ホームページ等

1. <http://www.s.kanazawa-u.ac.jp/phys/biophys/index.htm>
2. http://www.se.kanazawa-u.ac.jp/bioafm_center/index.htm
3. <http://www.kanazawa-u.ac.jp/university/administration/prstrategy/eacanthus/1010/11.html>
4. <http://www.jst.go.jp/pr/announce/20101011/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古寺 哲幸 (KODERA NORIYUKI)
金沢大学・バイオ AFM 先端研究センター・
准教授
研究者番号：30584635

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし